

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/092394 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005824
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 29 日 (29.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-096876 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5620036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾路 祐介 (OJI, Yusuke) [JP/JP]; 〒5640051 大阪府吹田市豊津町 1-14-1004 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: siRNA CAPABLE OF INHIBITING EXPRESSION OF WT1 GENE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: WT1 遺伝子の発現を抑制する siRNA およびその利用

(57) Abstract: It has been found that an siRNA targeting the 17AA site of WT1 gene not only is capable of inhibiting the expression of WT1 gene but also exerts striking apoptosis inducing effect and cytostatic effect for carcinoma cell strains.

(57) 要約: WT1 遺伝子の 17AA 部位を標的とする siRNA が WT1 遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果、および細胞死誘導効果を示すことを見出した。

WO 2005/092394 A1

明 細 書

WT1遺伝子の発現を抑制するsiRNAおよびその利用

技術分野

- [0001] 本発明は、WT1遺伝子の発現を抑制するsiRNAおよびその利用に関する。特に本発明は、該siRNAを利用した細胞増殖の抑制、または細胞死の誘導に関する。

背景技術

- [0002] ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、ジンクフィンガー型の転写因子をコードする遺伝子である。WT1は、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位に挿入された17個のアミノ酸(17AA)の有無とジンクフィンガー3-4間の3アミノ酸残基の有無によって区別される、4つのアイソフォームの存在が知られている。
- [0003] ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、小児腎腫瘍の原因遺伝子として単離された(非特許文献1、2)。ウイルス腫瘍でこの遺伝子の欠損や突然変異が見つかったこと等から、従来は癌抑制遺伝子と考えられてきた。
- [0004] しかし、本発明者らによる数々の報告は、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子というより、むしろ癌遺伝子様の機能を果たしていることを示唆している。変異のない野生型WT1遺伝子がほとんどすべての白血病細胞で高発現され、その発現レベルは白血病患者の予後と逆相関を示すこと(非特許文献3、4)、WT1アンチセンスDNAにより白血病細胞の増殖が特異的に抑制されること(非特許文献5)、マウス正常骨髄系前駆細胞および骨髄系前駆細胞株32D C13はWT1遺伝子の強制発現により好中球への分化が抑制され、増殖するようになること(非特許文献6)、等が明らかとなった。これらの知見は、WT1遺伝子は、造血系細胞の白血病化に関与していることを示すものである。また本発明者らは、野生型WT1遺伝子が種々の固形癌においても高発現していることを報告してきた(非特許文献7-14)。
- [0005] そこで本発明者らは、WT1遺伝子の発現を効率よく抑制することができれば、腫瘍特異的分子標的療法の開発につながると考えた。これまでに、WT1を標的とした腫瘍特異的分子標的療法の例は知られていない。

非特許文献1:Call KM, et al : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell 60 : 509, 1990

非特許文献2:Gessler M, et al : Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. Nature 343 ' . 774, 1990

非特許文献3:Inoue K, et al : WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 84 : 3071, 1994

非特許文献4:Inoue K, et al : Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. Blood 89 : 1405, 1997

非特許文献5:Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. Blood. 1996 Apr 1;87(7):2878-84.

非特許文献6:Inoue K, et al:Wilms' tumor gene(WT1)competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood 91:2969, 1998

非特許文献7:Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E.H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. Japanese Journal of Cancer Research, 90: 194-204, 1999.

非特許文献8:Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E.H., Kawakami, M., Ikegame, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. International Journal of Cancer, 100: 304-308, 2002.

非特許文献9:Ueda, T., Oji, Y., Naka, N., Nakano, Y., Takahashi, E., Koga, S., Asada, M., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Hosen, N., Tomita, Y., Aozasa, K.,

Tamai, N., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Science*, 94: 271-276, 2003.

非特許文献10: Oji, Y., Inohara, H., Nakazawa, M., Nakano, Y., Akahani, S., Nakatusuka, S., Koga, S., Abeno, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Iwai, S., Yoshida, K., Oka, Y., Ogawa, H., Yoshida, J., Aozasa, K., Kubo, T., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 94: 523-529, 2003.

非特許文献11: Oji, Y., Miyoshi, Y., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Nakatuska, S., Ikeba, A., Takahashi, E., Sakaguchi, N., Yokota, A., Hosen, N., Ikegame, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Aozasa, K., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Science*, 94: 606-611, 2003.

非特許文献12: Oji, Y., Yamamoto, H., Nomura, M., Nakano, Y., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Kiyotoh, E., Jomgeow, T., Sekimoto, M., Nezu, R., Yoshikawa, Y., Inoue, Y., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Souda, S., Aozasa, K., Monden, M., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Science*, 94: 712-717, 2003.

非特許文献13: Oji, Y., Miyoshi, S., Takahashi, E., Koga, S., Nakano, Y., Shintani, Y., Hirabayashi, H., Matsumura, A., Iuchi, K., Ito, K., Kishimoto, Y., Tsuboi, A., Ikegame, K., Hosen, N., Oka, Y., Ogawa, H., Maeda, H., Hayashi, S., Kawase, I., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in de novo non-small cell lung cancers. *Neoplasma*, 51:17-20, 2004.

非特許文献14: Oji, Y., Miyoshi, Y., Kiyotoh, E., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Hosen, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Ikegame, K., Oka, Y., Ogawa, H., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 34:74-7, 2004.

非特許文献15:Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, Abeno S, Tatsumi N, Yokota A, Aoyagi S, Nakazawa T, Ito K, Kanato K, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Aozasa K, Yoshimine T, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci.* 95:822-7, 2004.

非特許文献16:Oji Y, Yano M, Nakano Y, Abeno S, Nakatsuka S, Ikeba A, Yasuda T, Fujiwara Y, Takiguchi S, Yamamoto H, Fujita S, Kanato K, Ito K, Jomgeow T, Kawakami M, Tsuboi A, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Oka Y, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res.* 24:3103-8, 2004.

非特許文献17:Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, Abeno S, Ikeba A, Takashima S, Tsujie M, Yamamoto H, Sakon M, Nezu R, Kawano K, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Yoshikawa K, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 95:583-7, 2004.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると共に、該分子を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤、または細胞死誘導剤を提供することを課題とする。WT1遺伝子の発現を抑制する分子として、特に本発明は、siRNA、該siRNAをコードするDNA、および該DNAを含むベクターを提供する。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、近年遺伝子発現抑制の手段として注目されているsiRNAを癌細胞内で発現させるベクターを用いてWT1の発現を抑制することを考えた。試行錯誤の結果、本発明者らはWT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAおよび該RNAの相補鎖からなるsiRNAが、WT1遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。さらに、該siRNAが、ミトコンドリアを介した細胞死を誘導する効果、および、癌細胞の抗癌剤や細胞死誘

導剤に対する感受性を増強させる効果を有することを見出した。

[0008] すなわち、本発明者らはWT1を標的とするRNAi効果を利用した細胞増殖抑制剤、および細胞死誘導剤を開発することに成功し、これにより本発明を完成させるに至った。

[0009] 即ち、本発明は、以下の[1]～[20]を提供するものである。

[1] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

[2] 二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、[1]に記載の細胞増殖抑制剤

[3] 二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列番号:1に記載の塩基配列に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、[1]に記載の細胞増殖抑制剤

[4] 二重鎖RNAが配列番号:1に記載の塩基配列と配列番号:2に記載の塩基配列との対合を含む、[1]に記載の細胞増殖抑制剤

[5] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[1]に記載の細胞増殖抑制剤

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

[6] 標的細胞が癌細胞である、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

[7] 標的細胞が線維肉腫細胞、大腸癌細胞、白血病細胞、または胃癌細胞のいずれかである、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

[8] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞死誘導剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b) のDNAが挿入されたベクター

[9] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[8]に記載の細胞死誘導剤。

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

[10] 細胞死がミトコンドリアを介して誘導されることを特徴とする、[8]または[9]に記載の細胞死誘導剤。

[11] 標的細胞が癌細胞である、[8]～[10]のいずれかに記載の細胞死誘導剤。

[12] 標的細胞が線維肉腫細胞、大腸癌細胞、白血病細胞、または胃癌細胞のいずれかである、[8]～[10]のいずれかに記載の細胞死誘導剤。

[13] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞の抗癌剤に対する感受性を増強させる薬剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b) のDNAが挿入されたベクター

[14] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[13]に記載の薬剤。

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

[15] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞の細胞死誘導剤に対する感受性を増強させる薬剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

[16] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[15]に記載の薬剤。

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

[17] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞においてミトコンドリア膜電位を消失させる薬剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

[18] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[17]に記載の薬剤。

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

[19] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、細胞質へのチトクロムCの放出を増強する薬剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b) のDNAが挿入されたベクター

[20] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、[19]に記載の薬剤。

(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリ
ンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ベクター型WT1-siRNAによるHT-1080細胞の増殖抑制を示す図である。

[図2]ベクター型WT1-siRNAによる17AA(+) WT1 mRNAの発現抑制を示す写真である。

[図3]ベクター型WT1-siRNAの標的部位を示す図である。

[図4]ベクター型WT1-siRNAの構造を示す図である。

[図5]ベクター型WT1-siRNAによるWT1タンパク質の発現抑制を示す写真である。

[図6]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞の増殖抑制を示す図である。

[図7]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞の増殖抑制を示す図である。

[図8]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞のアポトーシスの誘導を示す図である。

[図9]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞のアポトーシスの誘導を示す図である。

[図10]ベクター型WT1-siRNAによるミトコンドリア膜電位の消失を示す図である。

[図11]ベクター型WT1-siRNAによるミトコンドリア膜電位の消失を示す図である。

[図12]ベクター型WT1-siRNAと抗癌剤ドキソルビシンの併用による癌細胞の増殖抑制を示す図である。

[図13]ベクター型WT1-siRNAと抗癌剤エトポシドの併用による癌細胞の増殖抑制を示す図である。

[図14]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞のドキソルビシン感受性の増強を示す図である。

[図15]ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞のエトポシド感受性の増強を示す図であ

る。

[図16]ベクター型WT1-siRNAおよび抗癌剤の併用による、癌細胞におけるチトクロムc放出の増強を示す写真である。

[図17]ベクター型WT1-siRNAおよび抗癌剤の併用による、癌細胞におけるミトコンドリア膜電子の消失の増強を示す図である。

[図18]ベクター型WT1-siRNAおよび抗癌剤の併用による、癌細胞におけるミトコンドリア膜電子の消失の増強を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 本発明のsiRNAは、標的であるWT1遺伝子の転写産物と相補的なRNA(アンチセンスRNA鎖)および該RNAに相補的なRNA(センスRNA鎖)が結合した二重鎖RNAである。本発明のsiRNAの標的となるWT1遺伝子の転写産物の配列としては、siRNAがRNAi効果を示しうる限り特に制限はない。好ましくは、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列である。本発明において「17AA 部位」とは、WT1遺伝子の転写産物の配列中、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位で17個のアミノ酸に相当する部位をさす。このような標的配列の具体的な例として、配列番号:1の配列を挙げることができる。本実施例において用いた、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に対するsiRNAのセンス鎖の塩基配列を配列番号:1に、アンチセンス鎖の塩基配列を配列番号:2に示した。本発明のsiRNAは、配列番号:1の塩基配列と配列番号:2の塩基配列の対合を含むものであることが特に好ましい。

[0012] siRNAは、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、毒性を示さない範囲の長さであれば特に限定はなく、例えば、15～49塩基対と、好適には15～30塩基対とすることができる。

[0013] dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ(対応する塩基が相補的でない)、バルジ(一方の鎖に対応する塩基がない)などにより不對合部分が含まれていてもよい。

[0014] 本発明のsiRNAの末端構造は、WT1遺伝子の発現をRNAi効果により抑制し得るのであれば、平滑末端あるいは粘着(突出)末端のいずれでもよい。また、粘着(突出

）末端構造は、3'末端側が突出している構造だけでなく、上記RNAi効果を誘導し得る限り5'末端側が突出している構造も含めることができる。また、突出する塩基数は、すでに報告がある2, 3塩基に限定されず、RNAi効果を誘導し得る塩基数とすることができる。例えば、この塩基数としては、1～8塩基、好適には、2～4塩基とすることができる。また、この突出している配列部分は、WT1遺伝子の転写産物との特異性が低いため、標的であるWT1遺伝子転写物の配列と相補的(アンチセンス)配列あるいは同じ(センス)配列である必要は必ずしもない。

[0015] 本発明のsiRNAは、WT1遺伝子、好ましくは17AA(+)アイソフォームの塩基配列を基に標的となる配列を選択し、調製することができる。17AA(+)アイソフォームとは、上述の17AAを有するアイソフォームをいう。本発明者らは、WT1の4種のアイソフォームのうち17AA(+)が癌遺伝子様機能を担っていることを明らかにしてきた(非特許文献6、非特許文献7)。調製は例えば、WT1遺伝子塩基配列に基づき、標的配列として転写産物であるmRNAの連続する領域、好ましくは17AA部位の領域の配列を選択する。選択した領域に対応する二重鎖RNAを、化学的in vitro合成系、ファージRNAポリメラーゼを用いたin vitro転写法、クローン化cDNAをもとに転写・会合した長いdsRNAをRNaseIIIまたはDicerによって切断する方法等によって、適宜調製することができる。実施例で使用したヒトWT1遺伝子のcDNA配列を配列番号6に示す。該WT1遺伝子の17AA 部位は、配列番号6に示した配列の第1137位から第1187位である。該WT1遺伝子は、NCBI GEN BANK NM_024426に登録されている。

[0016] 本発明のsiRNAは、WT1遺伝子中の任意の部位の塩基配列を基に標的となる配列を選択し、調整を行ってもよい。

[0017] WT1遺伝子中の好ましい塩基配列としては、WT1ゲノムDNA中第1500位から第1529位(配列番号:9)、第2059位から第2088位(配列番号:12)、第2928位から第2957位(配列番号:14)、第3256位から第3285位の塩基配列(配列番号:16)、またはこれらの配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列を挙げることが出来る。ストリンジントな条件下でハイブリダイズするとは、あらかじめ定められた配列をもつ分子(すなわち第2のポリペプチド)がDNAまたはRNAの試料中に存在する場合、適切にストリンジントな ハイブリダイゼーション条件の下で、ハイブリ

ダイズする、二本鎖になる、または本質的に互いにのみ結合する核酸分子を指す。ストリンジェントな条件とは、例えば、通常、42°C、2×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSの条件であり、さらに好ましくは、65°C、0.1×SSCおよび0.1%SDSの条件であるが、これらの条件に特に制限されない。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで最適なストリンジェンシーを実現することが可能である。

[0018] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、より好ましくは配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAを挙げることができる。

[0019] 本発明のsiRNAは、上記アンチセンスRNA鎖をコードするDNA(以下、アンチセンスコードDNA)および上記センスRNA鎖をコードするDNA(以下、センスコードDNA)を用いて、細胞内で発現させることもできる(以下、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAを本発明DNAと略称する。)。上記「アンチセンスコードDNA」および「センスコードDNA」は、プロモーターと共にそのまま細胞内の染色体に導入し、細胞内でアンチセンスRNA、センスRNAを発現させsiRNAを形成させることもできるが、効率的な細胞導入などを行うために、上記siRNA発現システムをベクターに保持させることが好ましい。ここで用いることができる「ベクター」は、導入したい細胞などに対応して選択することができる。例えば、哺乳動物細胞では、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、EBウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクターなどのウイルスベクターやカチオニックリポソーム、リガンドDNA複合体、ジーンガンなどの非ウイルスベクターなどが挙げられるが(Y. Niitsuら, Molecular Medicine 35: 1385-1395 (1998))、これらに限定されるものではない。また、ウイルスベクターではなく、ダンベル型DNA(Zanta M.A. et al., Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):91-6)、ヌクレアーゼ耐性を持つような修飾DNA、またはnaked

plasmidもまた好適に用いることができる(Liu F, Huang L. Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. J. Gene Med. 2001 Nov-Dec;3(6):569-76)

[0020] 本発明のsiRNAをコードするDNAを、ベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる場合がある。例えば、同一のベクターからアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる構成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpolIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA(siRNAコードDNA)が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモータを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖(アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖)の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A(アデニン)塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモータの種類を異ならせることが好ましい。

[0021] ベクターに挿入する本発明のsiRNAをコードするDNAとしては、標的配列のインバーテッドリピート間に適当な配列(イントロン配列が望ましい)を挿入し、ヘアピン構造を持つダブルストランドRNA(self-complementary 'hairpin' RNA(hpRNA))を作るようなコンストラクト(Smith, N.A. et al. Nature, 407:319, 2000、Wesley, S.V. et al. Plant J. 27:581, 2001、Piccin, A. et al. Nucleic Acids Res. 29:E55, 2001)を用いることもできる。

[0022] 本発明において、標的配列のインバーテッドリピート間に挿入される塩基配列は

特に限定されないが、好ましくは配列番号:18に記載の塩基配列(loop1)または配列番号:3中のループ配列AAAAC TCGAGAAAA、より好ましくは配列番号:19に記載の塩基配列(loop2)を挙げることが出来る。

[0023] また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

[0024] 即ち、本発明における「siRNA(二重鎖RNA)をコードするDNA」は、siRNAの双方の鎖をコードする一つのDNAであっても、それぞれの鎖をコードする2つのDNAの組合せであってもよい。また、「siRNA(二重鎖RNA)をコードするDNAが挿入されたベクター」は、siRNAのそれぞれの鎖を2つの転写産物として発現する一つのベクターであっても、siRNAの双方の鎖を1つの転写産物として発現する一つのベクターであってもよく、また、siRNAのそれぞれの鎖を発現する2つのベクターであってもよい。

[0025] RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上(例えば、96,97,98,99%以上)の配列の同一性を有する。塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0026] 本発明のsiRNA、該siRNAをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクターは、それぞれ、そのままあるいは適宜配合剤と混合して本発明の薬剤として使用することができる。本発明の薬剤を公知トランスフェクション試薬等を用いて細胞に導入すれば、細胞内でRNAi効果が発揮され、本発明の薬剤の効果が発現される。

- [0027] 本発明の「薬剤の効果」としては、細胞増殖抑制効果、細胞死誘導効果、または癌細胞の抗癌剤や細胞死誘導剤に対する感受性を増強させる効果等を挙げることが出来る。さらに、癌細胞においてミトコンドリア膜電位を失わせる効果や、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロムcの放出を増強する効果も本発明の効果として挙げることが出来る。
- [0028] 該効果は、一時的な効果であってもよいし、ある一定期間が経過した際に最終的に効果が発現されるものであってもよい。
- [0029] 本発明における、細胞死(アポトーシス)誘導効果としては、好ましくはミトコンドリアを介した細胞死の誘導効果が挙げられるが、特に限定されるものではない。
- [0030] 本発明の薬剤を癌細胞に添加し、癌細胞においてミトコンドリア膜電位の消失や、細胞質へのチトクロムCの放出の増強が確認された場合も、細胞死が誘導されたものとみなすことが出来る。
- [0031] 本発明において癌細胞の感受性が増強される抗癌剤は、特に限定されないが、好ましくは、ドキソルビシンまたはエトポシドを挙げることが出来る。また、本発明において癌細胞の感受性が増強される細胞死誘導剤は、特に限定されないが、好ましくは、癌細胞特異的細胞死誘導剤TRAILを挙げることが出来る。
- [0032] 本発明の薬剤の効果が期待される細胞は、WT1遺伝子を発現する細胞である。一例として、癌細胞を挙げることができる。より具体的には、白血病、大腸癌、肺癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、胃癌、甲状腺癌、骨および軟部肉腫、卵巣癌、子宮癌、腎癌、膝癌、またはグリオブラストーマにおける癌細胞を例示することができる。本発明における癌細胞は特に限定されないが、好ましくは、線維肉腫細胞、大腸癌細胞、白血病細胞、または胃癌細胞、より好ましくは、HT-1080、HL-60、SW620、またはAZ-521を挙げることが出来る。したがって、本発明の薬剤は、学術研究用としてのみならず、癌治療用医薬品、特に上記に列挙した癌を対象とする癌治療用医薬品として有効と考えられる。
- [0033] 本発明の薬剤を癌治療用医薬品として使用する場合は、適宜製剤化することができる。製剤化においては、薬学上許容される配合剤を混合することができる。薬学上許容される配合剤として、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安

定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。上記製剤の剤型の種類としては、例えば経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。また、本発明のDNAを生体内に投与する場合、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターを利用することができる。投与方法としては、例えばin vivo法およびex vivo法を挙げることができる。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

- [0034] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

＜実施例に用いた細胞＞

- [0035] 以下の実施例では、4種のWT1発現細胞株、線維肉腫細胞 HT-1080、胃癌細胞 AZ-521、大腸癌細胞SW620および前骨髄球性白血病細胞 HL-60と、1種のWT1非発現細胞株である肺癌細胞 PC-14を用いた。HT-1080、AZ-521およびPC-14はDMEM 10%FBS含有培地、SW620およびHL-60はRPMI 10%FBS含有培地で、37℃、5%CO₂下で培養した。

- [0036] [実施例1]WT1遺伝子mRNA 17AA部位を標的とするsiRNA発現ベクターの作製

WT1遺伝子mRNA 17AA部位を標的とするsiRNA発現ベクター作製のため、挿入するDNAを作製した。該標的部位の具体的位置は、配列番号6に示したWT1遺伝子配列の第150位から第179位である。作製した配列を下記に示す(配列番号:3)。

5'- C CCT TCT GTC CAT TTC ACT GAG CTG GAG CT

(標的RNAのアンチセンス鎖-30mer-をコードするDNA)-

-AAACTCGAGAAAA (ループシークエンスXhoIサイトを含む)-

-AG CTC CAG CTC AGT GAA ATG GAC AGA AGG G

(標的RNAのセンス鎖-30mer-をコードするDNA)-

-GGTACCCCCGGATATCTTTTTTTT-3'

[0037] 上記DNAをsiRNA発現ベクターのクローニング部位に挿入し、WRI4ベクターを作製した。siRNA発現ベクターは、東京大学大学院工学系研究科 川崎広明先生から供与をうけたsiRNA発現ベクター(pPuro-tRNA-SKE vector)を使用した。

pPuro-tRNA-SKE vectorの代わりに、piGENetRNA Pur Vector (クローンテック社)を使用することも可能である。

[0038] また、WT1遺伝子mRNAの4種のアイソフォームの共通配列を標的とするsiRNA発現ベクターとして、WRI3ベクターを作製した。WRI3ベクターは、

aag gtg gct cct aag ttc atc tga ttc cag(アンチセンスRNA鎖をコードするDNA、配列番号4)

ctg gaa tca gat gaa ctt agg agc cac ctt(センスRNA鎖をコードするDNA、配列番号5)を含む。WRI3による標的部位は、配列番号6に示したWT1遺伝子配列の第1101位から1130位である。

[0039] [実施例2]細胞培養およびsiRNA発現ベクターの導入

WT1遺伝子を高発現するFibrosarcoma cell line HT-1080細胞を10%含Dulbecco's Modified Medium(DMEM) 中で培養した。トリプシナイズしたHT-1080細胞 2×10^4 cells/2mlを6 well plateにまき、24時間後にFugene 6 (ROCHE)を用いてWRI4ベクターあるいは空ベクター2 μ gをHT-1080細胞へ導入した。

[0040] [実施例3]siRNA発現ベクターによるHT-1080細胞の増殖抑制

WRI4ベクターによる細胞増殖抑制効果を検討した。ベクターを導入したHT-1080細胞を、24h、48h、または72h培養し、細胞数を算定した。細胞数の算定は、トリプシナイズした後算定板を用いて算定した。

[0041] HT-1080細胞にWT1に対するsiRNA発現ベクターを導入するとコントロールの空ベクターを導入したときに比べ有意にHT-1080細胞の増殖を抑制した。結果を図1に示す。

[0042] また、WRI3発現ベクターをHT-1080細胞に導入し、細胞増殖抑制効果を検討した

ところ、WRI4発現ベクターより弱い、一定の細胞増殖抑制効果を確認できた。

[0043] [実施例4] siRNA発現ベクターによるWT117AA mRNAの発現抑制

WRI4ベクターによるWT117AA mRNAの発現抑制効果をRT-PCR法により検討した。

[0044] HT-1080細胞 2×10^4 細胞に対しWT1 17AA部位に対するRNAi発現ベクターWRI-4または空ベクター $2 \mu\text{g}$ をFugene6 (Roche)を用いてLipofectionにより細胞内に導入した。導入後96Hrで細胞を回収した。細胞をトリプシナイズしPBSにて2回洗浄後、Trizolを用いてtotal RNAを抽出し、 $2 \mu\text{g}$ のtotal RNAを鋳型とし、dT primerを用いMMLV reverse transcriptase存在下でcDNAを合成した。次に、WT1の17AA部位をはさむように設計したフォワードプライマー 5'-gac ctg gaa tca gat gaa ctt ag -3' (配列番号7) 及びリバースプライマー 5'-gag aac ttt cgc tga caa gtt -3' (配列番号8)を用いてPCRを行い、そのPCR産物をアガロースゲル中で電気泳動を行って、WT1 17AA(+)および17AA(-) mRNAの発現について解析した。

[0045] 結果を図2に示す。WRI-4発現ベクターを導入した細胞で17AA(+) WT1 mRNAの発現の低下が認められた。

[0046] [実施例5] siRNA vectorsの構築

loop1配列(40nt、配列番号:18)を含むWT1mRNAに特異的な配列(センス鎖(30nt) - loop1(40nt、配列番号:18) - アンチセンス鎖(30nt))のオリゴヌクレオチドを1種類、およびloop2配列(10nt: human pre-miR-23のloop配列、配列番号:19)を含むWT1mRNAに特異的な配列(センス鎖(30nt) - loop2(10nt、配列番号:19) - アンチセンス鎖(30nt))のオリゴヌクレオチドを5種類合成した(Japan Bio Service)。これらのオリゴヌクレオチドをアニーリングした後piGENEtRNA Pur Vector (Clontech)のtRNA^{Val} promoterの下流に挿入し、loop1(40nt、配列番号:18)を含むdsRNAを転写するloop1-WRI-4、および、loop2(10nt)を含むdsRNAを転写するWRI-4、WRI-4m、WRI-16m、WRI-17m、およびWRI-18mの計6種類のsiRNA vectorを作製した。これらのうちmと表示されているものはベクター型WT-siRNAの効果を高めるためにセンス鎖に変異を挿入した配列をもつベクターである。それぞれのsiRNA vectorの標的部位および配列を図3、図4および表1に示す。

[0047] [表1]

siRNA Vector	Sequence ^a	配列番号	Loop ^b	Position in WT1
loop1- WRI-4	Target Sequence	9	loop 1	1500-1529
	Sense sequence	10		
WRI-4	Target Sequence	9	loop 2	1500-1529
	Sense sequence	10		
WRI-4m	Target Sequence	9	loop 2	1500-1529
	Sense sequence	11		
WRI-16m	Target Sequence	12	loop 2	2059-2088
	Sense sequence	13		
WRI-17m	Target Sequence	14	loop 2	2928-2957
	Sense sequence	15		
WRI-18m	Target Sequence	16	loop 2	3256-3285
	Sense sequence	17		

a:sense sequenceの下線は変異の挿入を示す。

b:loop1の配列はAAAACTCGAGAAAAAAGGGAGC

ACAACCATCTGCATTTGAGAGG(配列番号:18)、loop2の配列はCTTCCTGTCA(配列番号:19)である。

[0048] [実施例6] ベクター型WT1-siRNA によるWT1遺伝子の発現抑制

WT1mRNAの様々な部位を標的とする6種類のベクター型WT1-siRNA :

loop1-WRI4, WRI-4, WRI-4m, WRI-16m, WRI17m, WRI-18mまたはWRI-4m, WRI-16m, WRI17m, WRI-18mの混合物 (図3、図4および表1) の線維肉腫細胞 HT-1080におけるWT1遺伝子発現抑制効率について検討した。

[0049] HT-1080細胞を6種類のベクター型WT1-siRNA、あるいはMockベクターで処理後72時間後にWT1タンパクの発現レベルをウェスタンブロットにて解析した。

[0050] siRNA vectorsおよびMockベクターによる処理は以下の工程で行った。前日に6 well plateに細胞を蒔き、翌日WT1-siRNA expression vector、およびMockベクターをFuGENE6 (Roche) を用いてリポフェクション法によりトランジェントに発現させ、3日後トリプシナイズした後、細胞数を算定し、ウェスタンブロット解析にてこれらの細胞におけるWT1タンパクの発現レベルを解析した。

[0051] ウェスタンブロット解析は以下の工程で行った。siRNA発現ベクター、およびMockベクターをトランジェントに発現させた細胞をSDSサンプルバッファーに溶解し、タンパク質をSDS-PAGEにて分離後、PVDFメンブレンに転写した。1次抗体に抗WT1抗体C-19 (Santa Cruz Biotechnology)、抗チトクロムC抗体 (Pharmingen)、または抗GAPDH抗体 (Chemicon) を、2次抗体にALP conjugated antirabbitまたはantimouse抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてBCIP-NBT キットにて発色した。

[0052] 上記のウェスタンブロット解析の結果、WT1を標的としたすべてのベクター型WT1-siRNAによってWT1タンパクの発現が低下していることが明らかとなった。これらのうち、WRI-4、WRI-4m、WRI-16m、WRI-18m、およびWRI-4m+16m+17m+18mで処理した場合、mockベクターを導入したものに比べタンパクの発現レベルは10~20%のレベルにまで低下したが、loop1-WRI-4、WRI-17により処理した場合WT1タンパクの発現の低下の程度は少なかった (図5)。

[0053] [実施例7]ベクター型WT1-siRNAによる腫瘍細胞のWT1特異的増殖抑制

ベクター型WT1-siRNAの細胞増殖に及ぼす影響を解析するために6種類のベクター型WT1-siRNAである、loop1-WRI4, WRI-4, WRI-4m, WRI-16m, WRI17m, WRI-18mまたは、WRI-4m, WRI-16m, WRI17m, およびWRI-18mの混合物導入後72時間における細胞数をカウントした。WT1発現細胞株HT-1080線維肉腫細胞においてすべてのWT1-siRNA処理はMockベクターでの処理に比べ有意に細胞増殖を抑制した。なかでもWRI-4mは90%以上増殖を抑制した。それに対してWT1非発現細胞株PC-14肺癌細胞においては6種類のベクター型WT1-siRNAのいずれの処理によっても細胞増殖は抑制されなかった(図6)。

[0054] さらに2種類のベクター型WT1-siRNA (WRI-4mおよびWRI-16m)が種々のWT1発現癌細胞の増殖を抑制できるかを調べるために、これらのベクターを3種のWT1発現細胞株、AZ-521胃癌細胞、SW620大腸癌細胞およびHL-60白血病細胞に導入し72時間後において細胞数をカウントした。

[0055] 以上の結果、3種すべてのWT1発現癌細胞においてWRI-4m および WRI-16m での処理はMock vectorでの処理に比べ有意に増殖を抑制した(図7)。

[0056] [実施例8] ベクター型WT1-siRNAによるアポトーシスの誘導

ベクター型WT1-siRNAによる癌細胞の増殖抑制の機序を明らかにするために、ベクター型WT1-siRNA処理後の細胞におけるアポトーシスの誘導について解析した。2種のWT1発現細胞株HT-1080、AZ-521およびWT1非発現細胞株PC-14においてWRI-4m処理後AnnexinV-FITCおよびPIで二重染色し、フローサイトメリーにて解析した。

[0057] フローサイトメリーによるアポトーシス解析は以下の工程により行った。まず、アポトーシス細胞を検出するために、 1.0×10^5 個の細胞をPBSで洗浄した後MEBCYTO Apoptosis kit (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan)を用いてAnnexin V-FITC、およびPIにより室温で15分間反応させ染色した。これらの細胞をFACScan flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) で解析し、Annexin V-FITC陽性細胞をアポトーシス細胞として定義した。

[0058] 以上の結果、WRI-4m処理はWT1発現細胞株HT-1080細胞の71.1%、AZ-521細胞

の40.6%の細胞においてアポトーシスを誘導した。これに対してWT1非発現細胞株PC-14においては、WRI-4m処理はアポトーシスを誘導しなかった(図8および図9)。

[0059] [実施例9] ベクター型WT1-siRNAによるミトコンドリア膜電位消失

ベクター型WT1-siRNAによるアポトーシス誘導がミトコンドリアを介する経路によるものかどうかを明らかにするために、WT1発現細胞株HT-1080細胞、WT1非発現細胞株PC-14細胞をWRI-4mあるいはMockベクターで処理し72時間後においてミトコンドリア膜電位の状態をMitoLight染色後フローサイトメリーにて解析した。

[0060] アポトーシス誘導によるミトコンドリア膜電位の変化($\Delta \Psi_m$)の解析は、MitoLight apoptosis detection kit (Chemicon)を用いて行った。アポトーシス誘導後の細胞をミトコンドリア染色色素であるMitoLightを含むバッファーにて37°C、15分インキュベーションし、FACScanのFL2チャンネルにて解析した。

[0061] 以上の結果、WT1発現細胞株であるHT-1080においてWRI-4m処理はMockベクター処理に比べて有意にミトコンドリア膜電位の消失を誘導した。しかしWT1非発現細胞株であるPC-14においてはWRI-4m処理はミトコンドリア膜電位の消失を誘導しなかった(図10および図11)。これらの結果はベクター型WT1-siRNAによるアポトーシス誘導がミトコンドリアを介する経路によるものであることを示す。

[0062] [実施例10] ベクター型WT1-siRNAと抗がん剤の併用による細胞増殖抑制の増強
抗がん剤の多くはミトコンドリアを介する経路を通じて癌細胞にアポトーシスを誘導する。そこでミトコンドリアの膜電位を消失させるベクター型WT1-siRNAを化学療法剤と併用することにより、癌細胞の抗がん剤に対する感受性を増強することができるのではないかと考えた。そこでベクター型WT1-siRNA (WRI-4mあるいはWRI-16m)処理を行った細胞と行わなかった細胞に対する抗がん剤ドキソルビシンおよびエトポシドの細胞増殖抑制を解析した。

[0063] siRNAベクターと化学療法剤、death ligandとの併用は以下の工程により行った。前日に6 well plateに細胞を蒔き、翌日ベクター型WT1-siRNA、およびMockベクターをFuGENE6 (Roche)を用いてリポフェクション法によりtransientに発現させ、48時間後25 μ Mのエトポシド(WAKO)、0.2 μ Mのドキソルビシン(Sigma)または50mg/mlのTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Peprotech)でさらに24時間処理した

。

- [0064] その結果、ベクター型WT1-siRNAとドキソルビシンあるいはエトポシドの併用によりHT-1080細胞はドキソルビシンあるいはエトポシド単独にくらべ細胞増殖を抑制することが明らかとなった(図12および図13)。
- [0065] さらにベクター型WT1-siRNA処理後の抗がん剤に対する感受性を解析するために併用処理した場合の細胞数とベクター単独処理した場合の細胞数の差のベクター単独処理した場合の細胞数に対する割合を求めた。その結果、図14および図15に示すようにHT-1080細胞においてベクター型WT1-siRNA処理によりドキソルビシンおよびエトポシドに対する感受性が増強されることが明らかとなった。
- [0066] [実施例11] ベクター型WT1-siRNAと抗がん剤の併用によるミトコンドリアを介するアポトーシスの誘導の増強
- [0067] ベクター型WT1-siRNAと抗がん剤の併用による細胞増殖抑制の増強がミトコンドリアを介するアポトーシスの誘導の増強によるものであることを明らかにするために、ベクター型WT1-siRNAとドキソルビシンまたはエトポシドの併用処理後におけるミトコンドリアから細胞質へのチトクロムCの放出を解析した。
- [0068] ミトコンドリアから細胞質へのチトクロムC放出の解析は以下の工程で行った。細胞をPBSで洗浄し、氷冷したSTEバッファー(250mM sucrose, 25mM Tris, and 1mM EDTA, pH6.8)で溶解し、15,000回転15分遠心した。上清を等量の2x Laemili's SDS サンプルバッファーと混合しウェスタンブロット解析に使用するまで-20℃で保存した。
- [0069] 以上の解析の結果、図16に示すようにWRI-4mとそれぞれの薬剤との併用処理後、細胞質へのチトクロムCの放出が増強することが明らかとなった。
- [0070] ベクター型WT1-siRNAとドキソルビシン、エトポシドあるいはTRAILのそれぞれとの併用処理後のミトコンドリア膜電位をフローサイトメトリーにより評価した。WRI-4mとドキソルビシン、WRI-4mとエトポシドを併用処理することで、抗がん剤単独処理に比べ、ミトコンドリア膜電位の消失が有意に増強された(図17および図18)。
- [0071] さらに癌特異的なアポトーシス誘導剤として注目されているTRAILとベクター型WT1-siRNAの併用効果について解析したところ、ドキソルビシンやエトポシドとの併用と同様に、併用処理後チトクロムCの放出の増強(図16)およびミトコンドリア膜電位

の消失の増強(図17および図18)がみられた。

産業上の利用可能性

- [0072] 本発明によって、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができるsiRNA、および該siRNAを有効成分とする細胞増殖抑制剤が提供された。また、該siRNAを有効成分とする細胞死誘導剤、および癌細胞の抗癌剤や細胞死誘導剤に対する感受性を増強させる薬剤が提供された。
- [0073] WT1遺伝子は、癌細胞に高発現することが知られていることから、本発明の薬剤は、新規抗癌剤として特に有用である。また、本発明のsiRNAを有効成分とする薬剤は、従来の抗癌剤の効果を増強させる働きがあり、従来の抗癌剤治療をより改善するものと考えられる。

請求の範囲

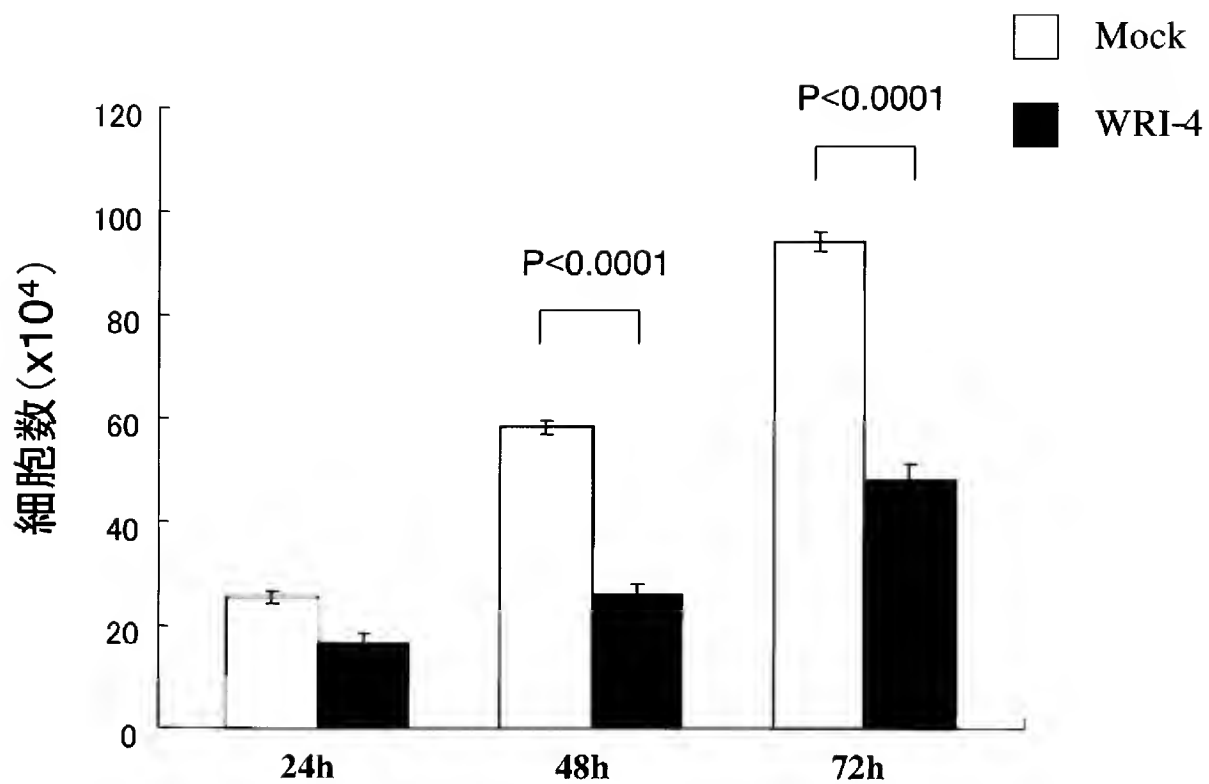
- [1] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。
(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA
(c) (b)のDNAが挿入されたベクター
- [2] 二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
- [3] 二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列番号:1に記載の塩基配列に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
- [4] 二重鎖RNAが、配列番号:1に記載の塩基配列と配列番号:2に記載の塩基配列との対合を含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
- [5] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤
(a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
(b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリレンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
(c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- [6] 標的細胞が癌細胞である、請求項1～5のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
- [7] 標的細胞が線維肉腫細胞、大腸癌細胞、白血病細胞、または胃癌細胞のいずれかである、請求項1～5のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
- [8] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞死誘導剤。
(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA
(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

- [9] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項8に記載の細胞死誘導剤。
- (a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- (b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- [10] 細胞死がミトコンドリアを介して誘導されることを特徴とする、請求項8または9に記載の細胞死誘導剤。
- [11] 標的細胞が癌細胞である、請求項8～10のいずれかに記載の細胞死誘導剤。
- [12] 標的細胞が線維肉腫細胞、大腸癌細胞、白血病細胞、または胃癌細胞のいずれかである、請求項8～10のいずれかに記載の細胞死誘導剤。
- [13] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞の抗癌剤に対する感受性を増強させる薬剤。
- (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
- (b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA
- (c) (b)のDNAが挿入されたベクター
- [14] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項13に記載の薬剤。
- (a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- (b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- [15] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞の細胞死誘導剤に対する感受性を増強させる薬剤。
- (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

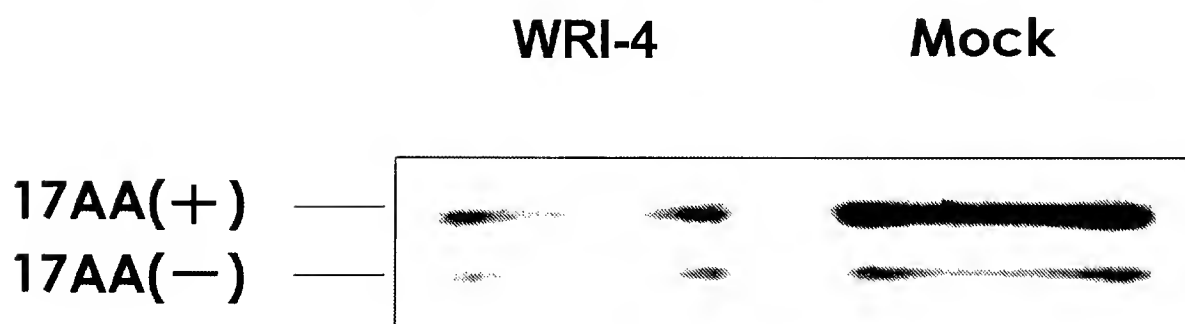
- (b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA
 - (c) (b) のDNAが挿入されたベクター
- [16] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項15に記載の薬剤。
- (a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
 - (b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA
 - (c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- [17] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、癌細胞においてミトコンドリア膜電位を消失させる薬剤。
- (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
 - (b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA
 - (c) (b) のDNAが挿入されたベクター
- [18] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項17に記載の薬剤。
- (a) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
 - (b) 配列番号:9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA
 - (c) 配列番号:11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- [19] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、細胞質へのチトクロムCの放出を増強する薬剤。
- (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
 - (b) (a) の二重鎖RNAをコードするDNA
 - (c) (b) のDNAが挿入されたベクター
- [20] 二重鎖RNAが、以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNAにコードされるRNA、および該RNAに相補的なRNAを含む二重鎖RNAである、請求項19に記載の薬剤。

- (a) 配列番号: 9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA
- (b) 配列番号: 9、12、14、または16のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (c) 配列番号: 11、13、15、または17のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA

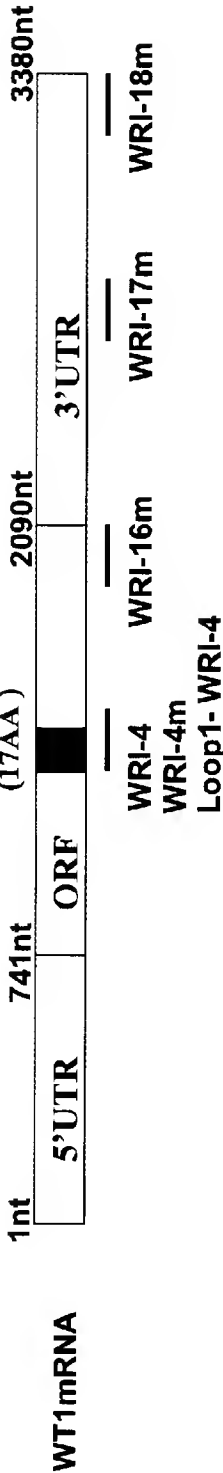
[図1]



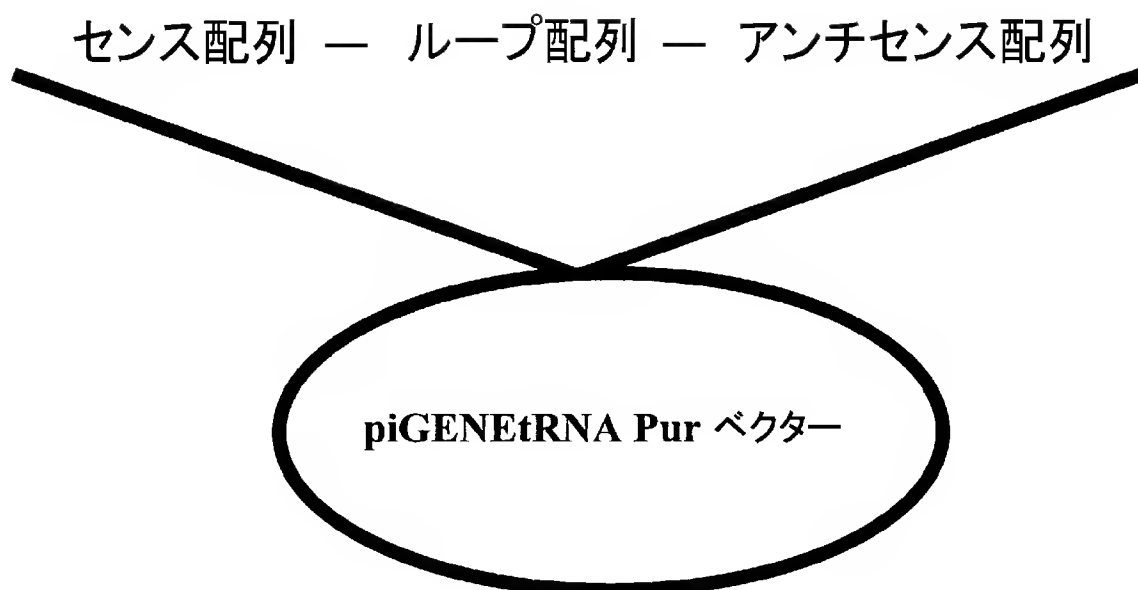
[図2]



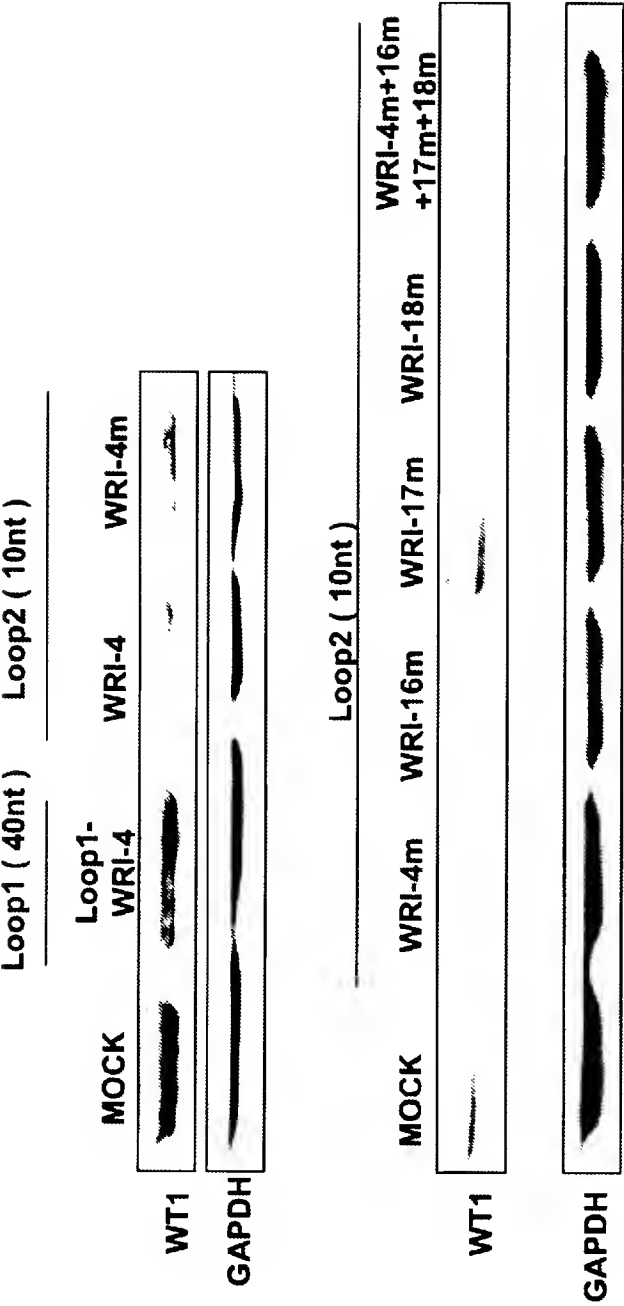
[図3]



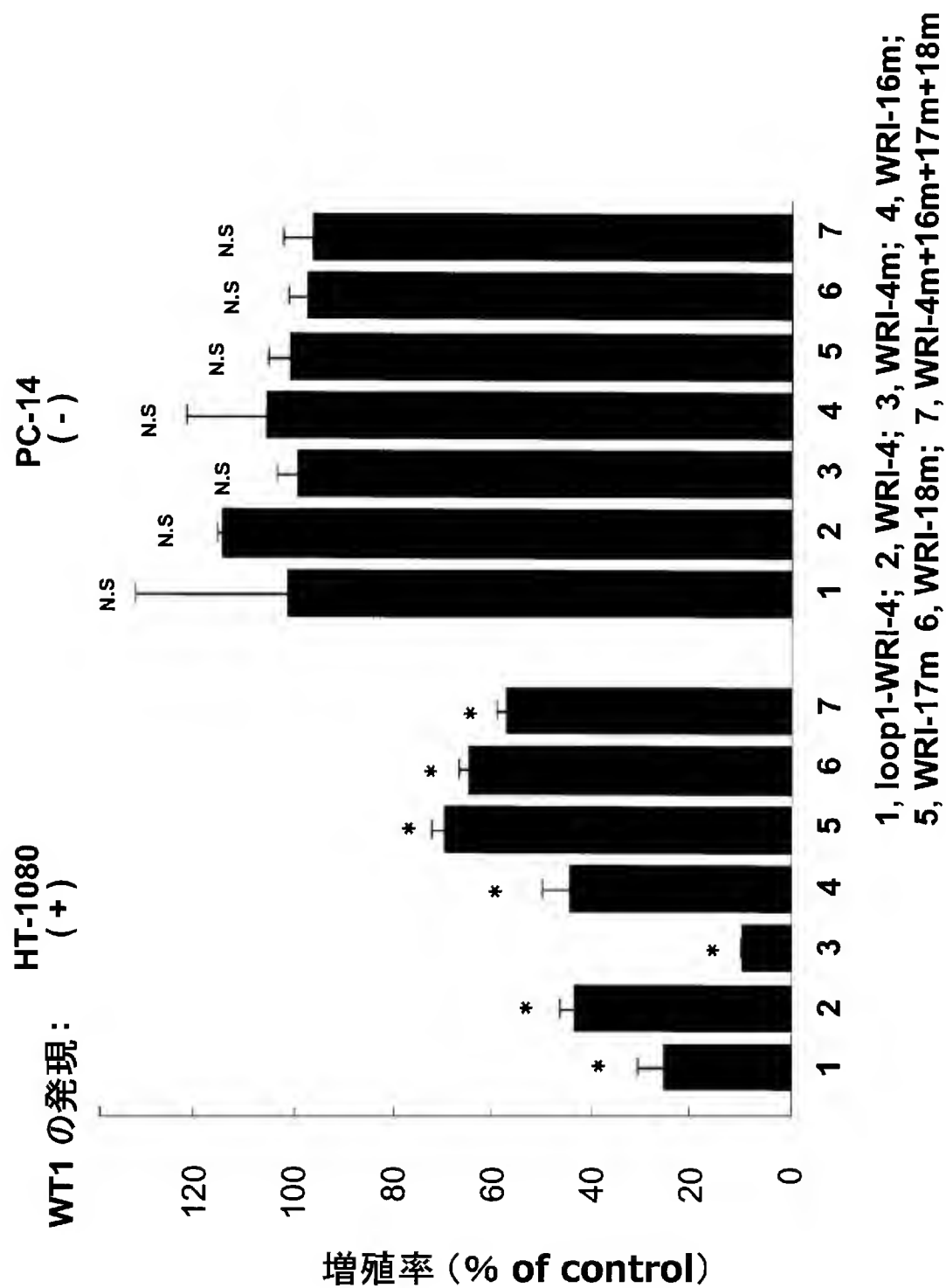
[図4]



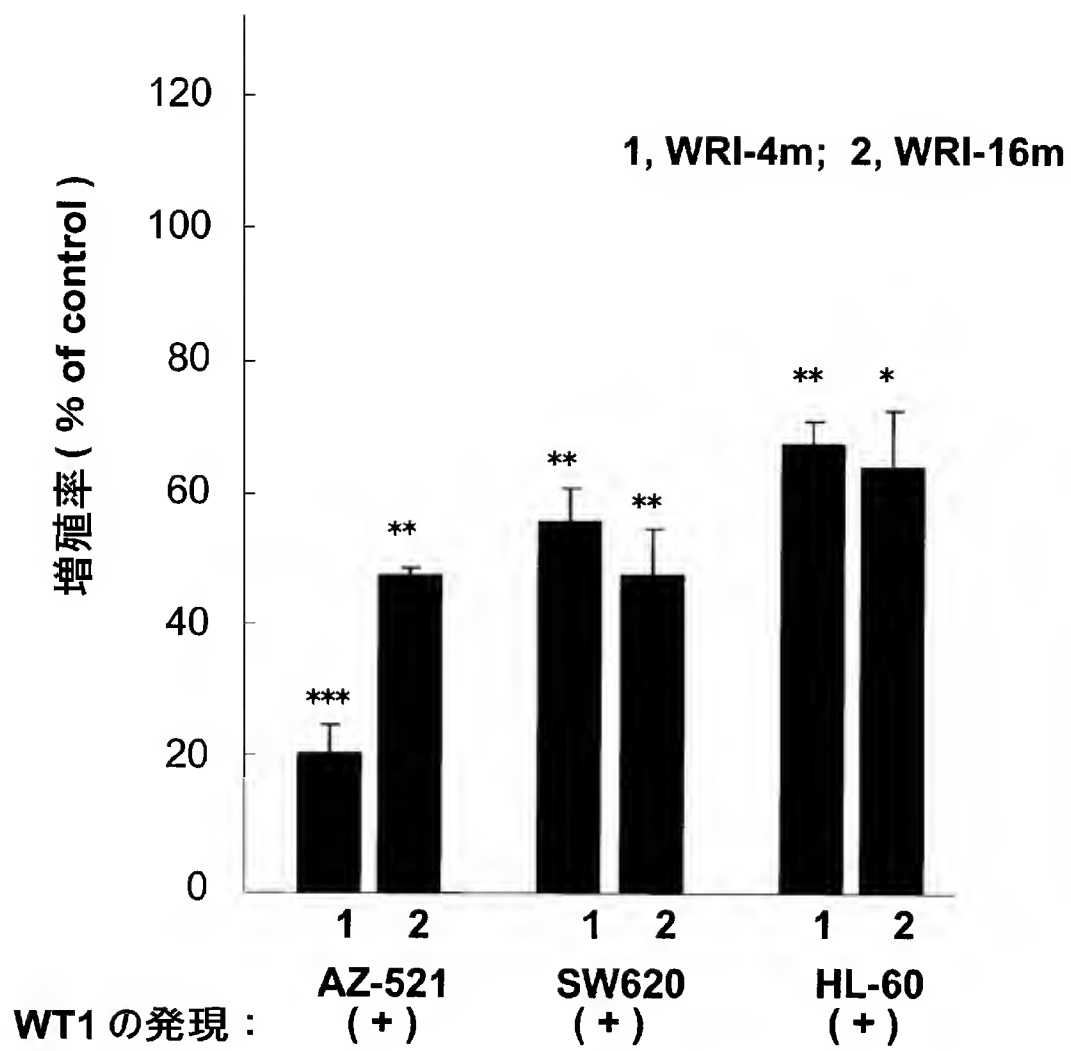
[図5]



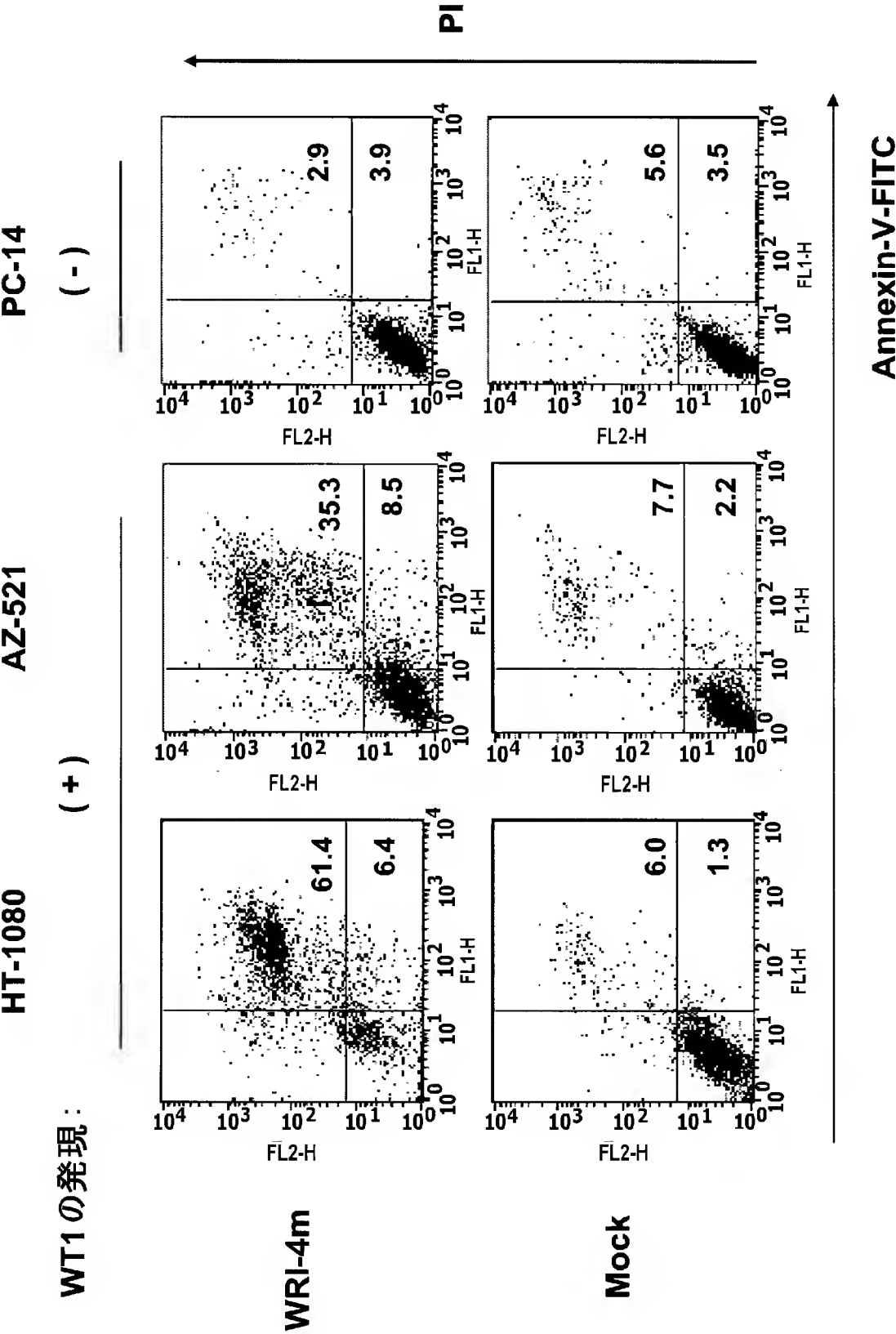
[図6]



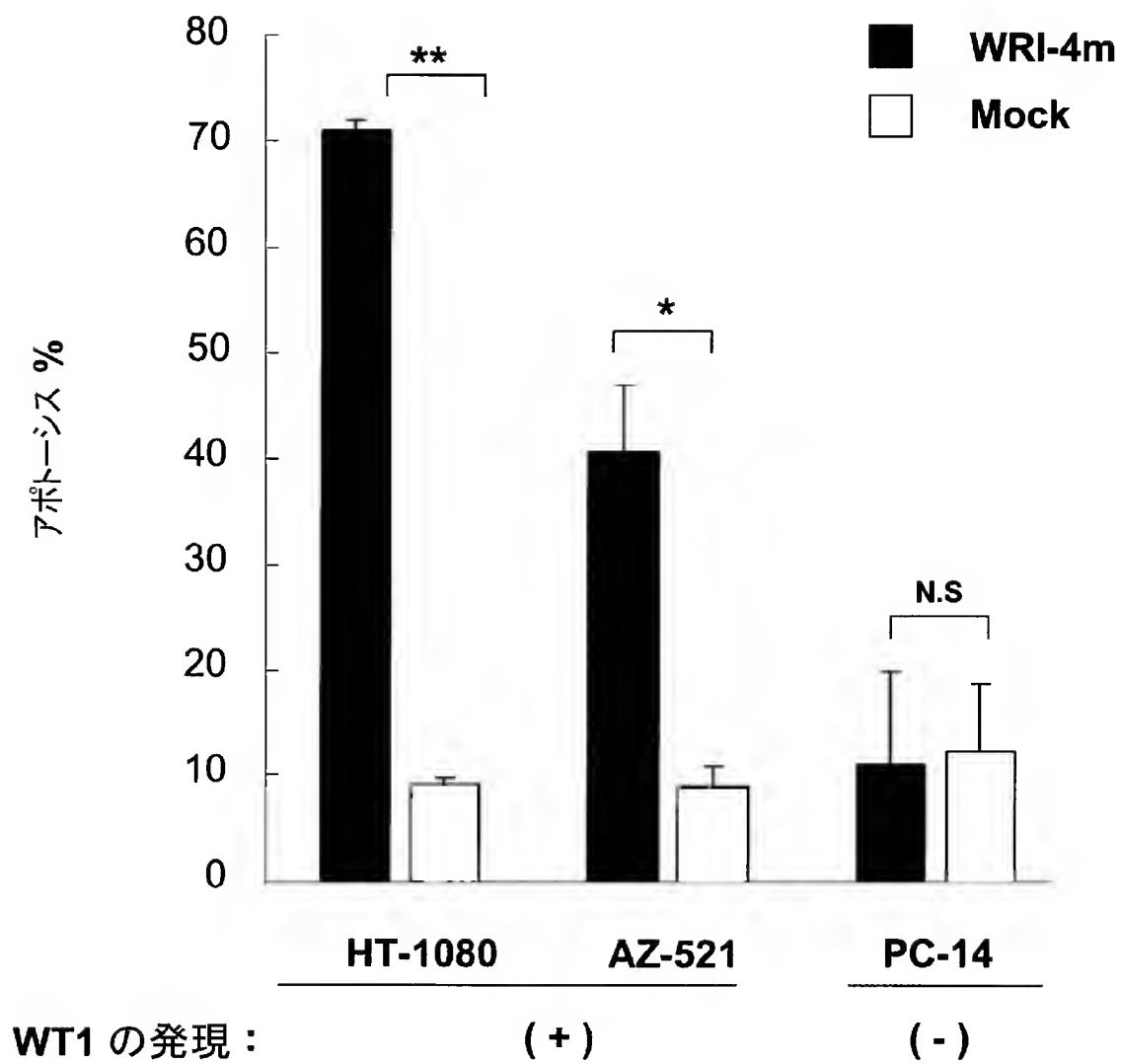
[図7]



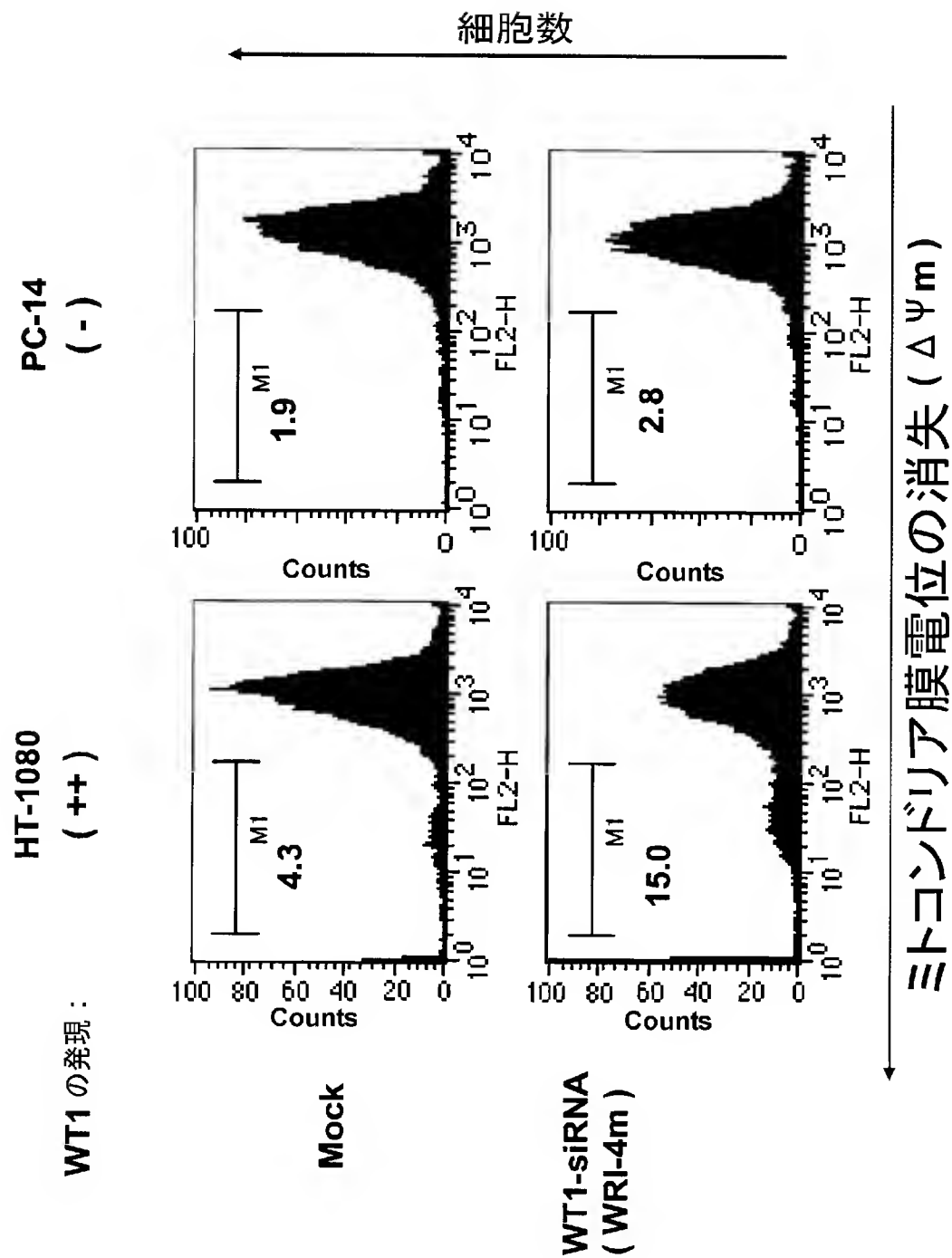
[図8]



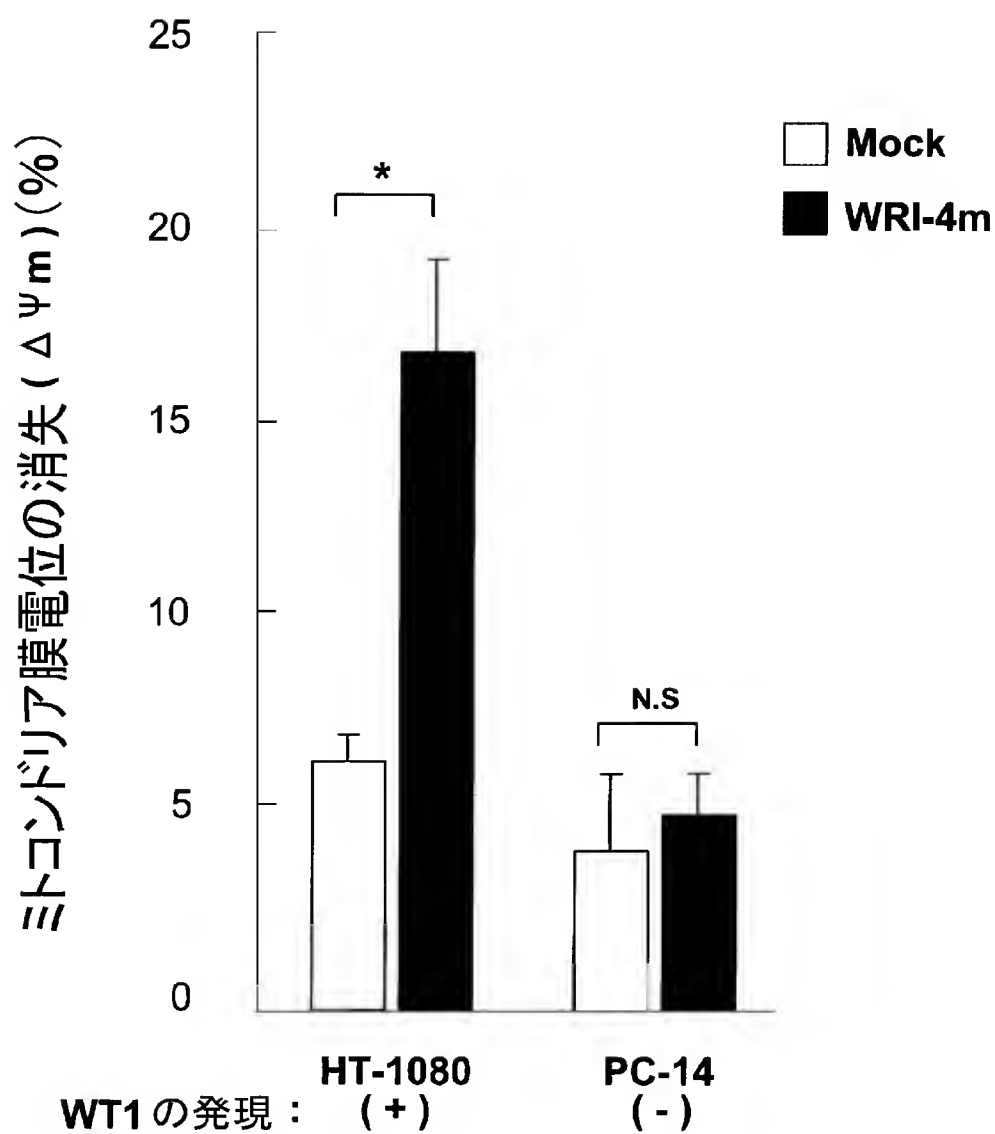
[図9]



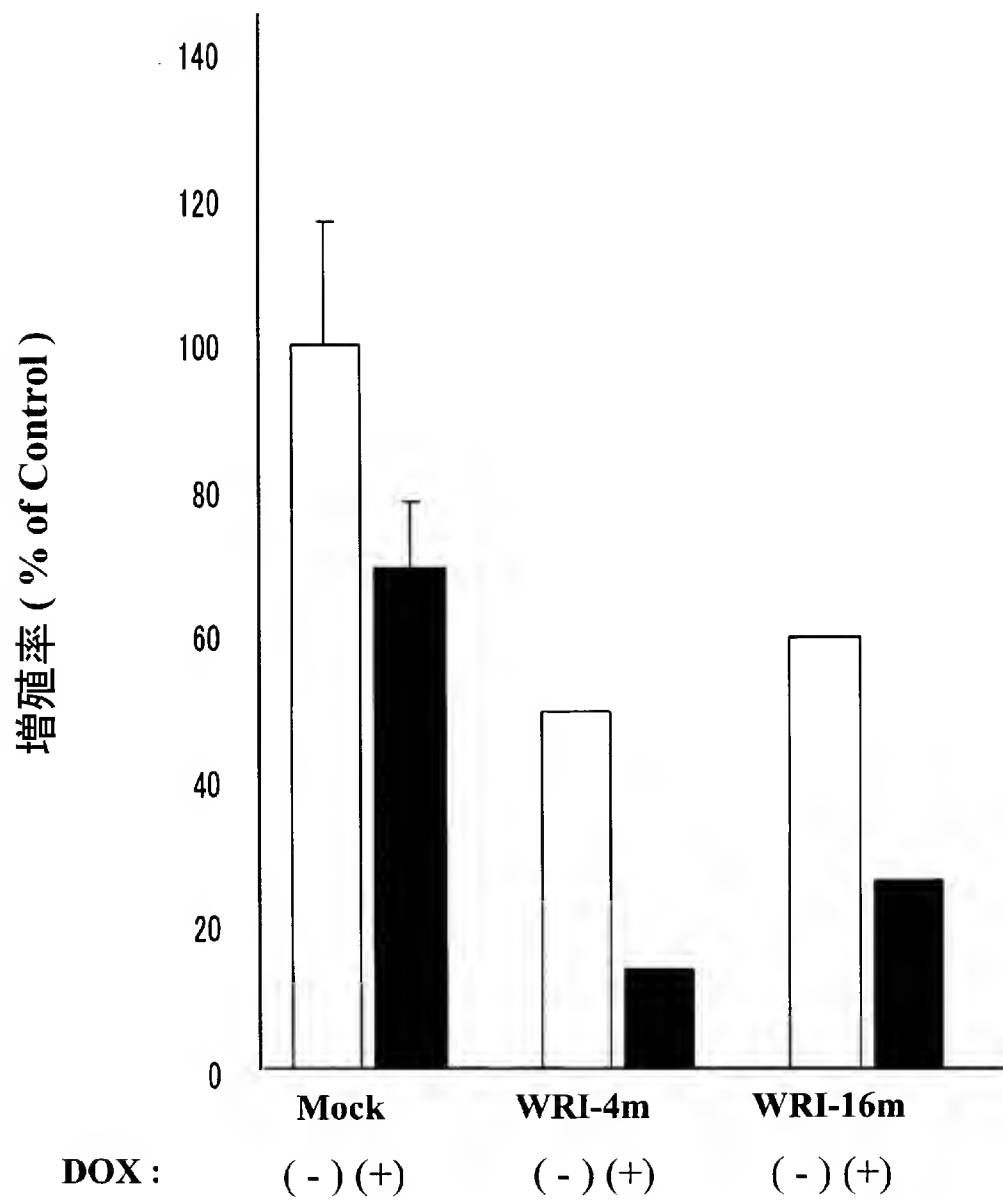
[図10]



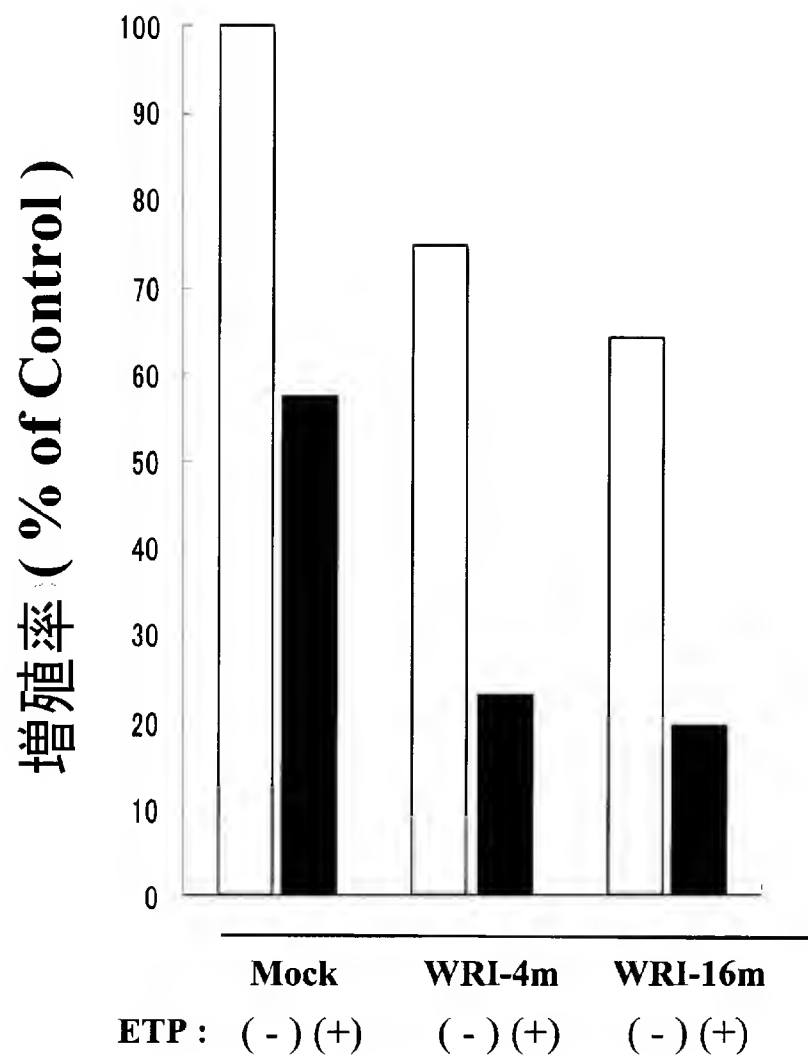
[図11]



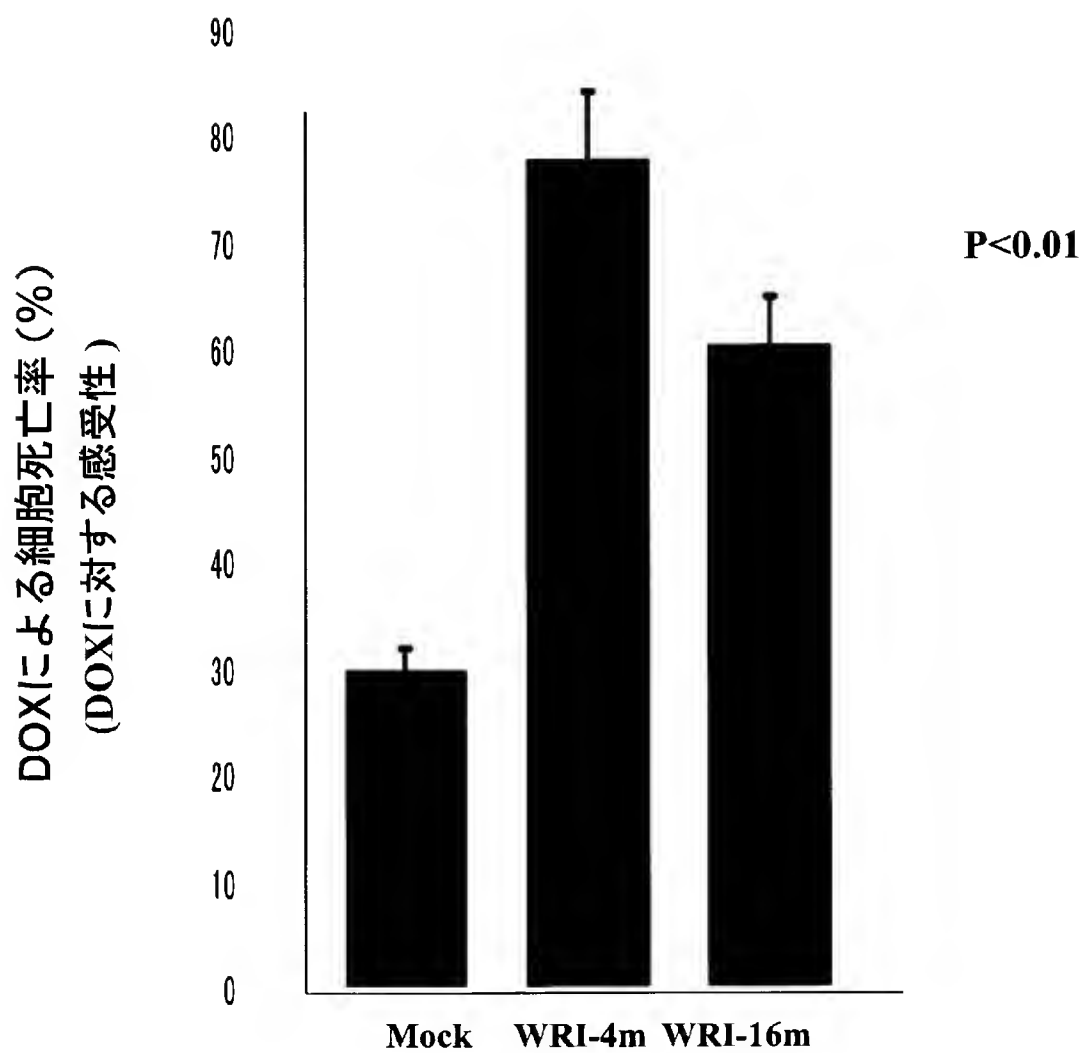
[図12]



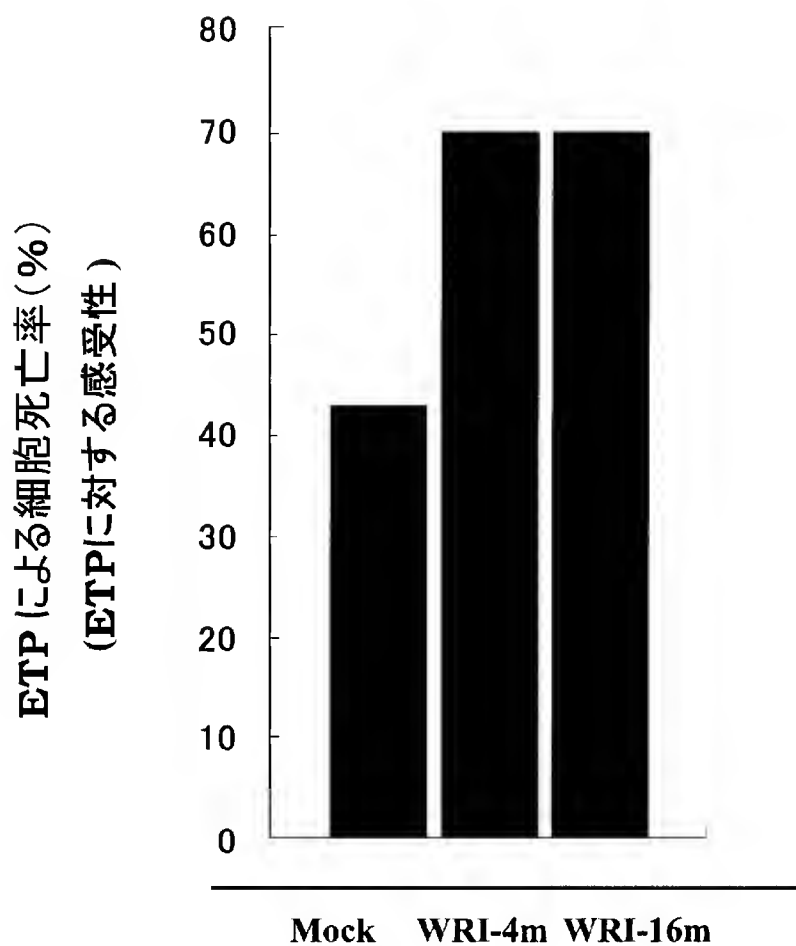
[図13]



[図14]

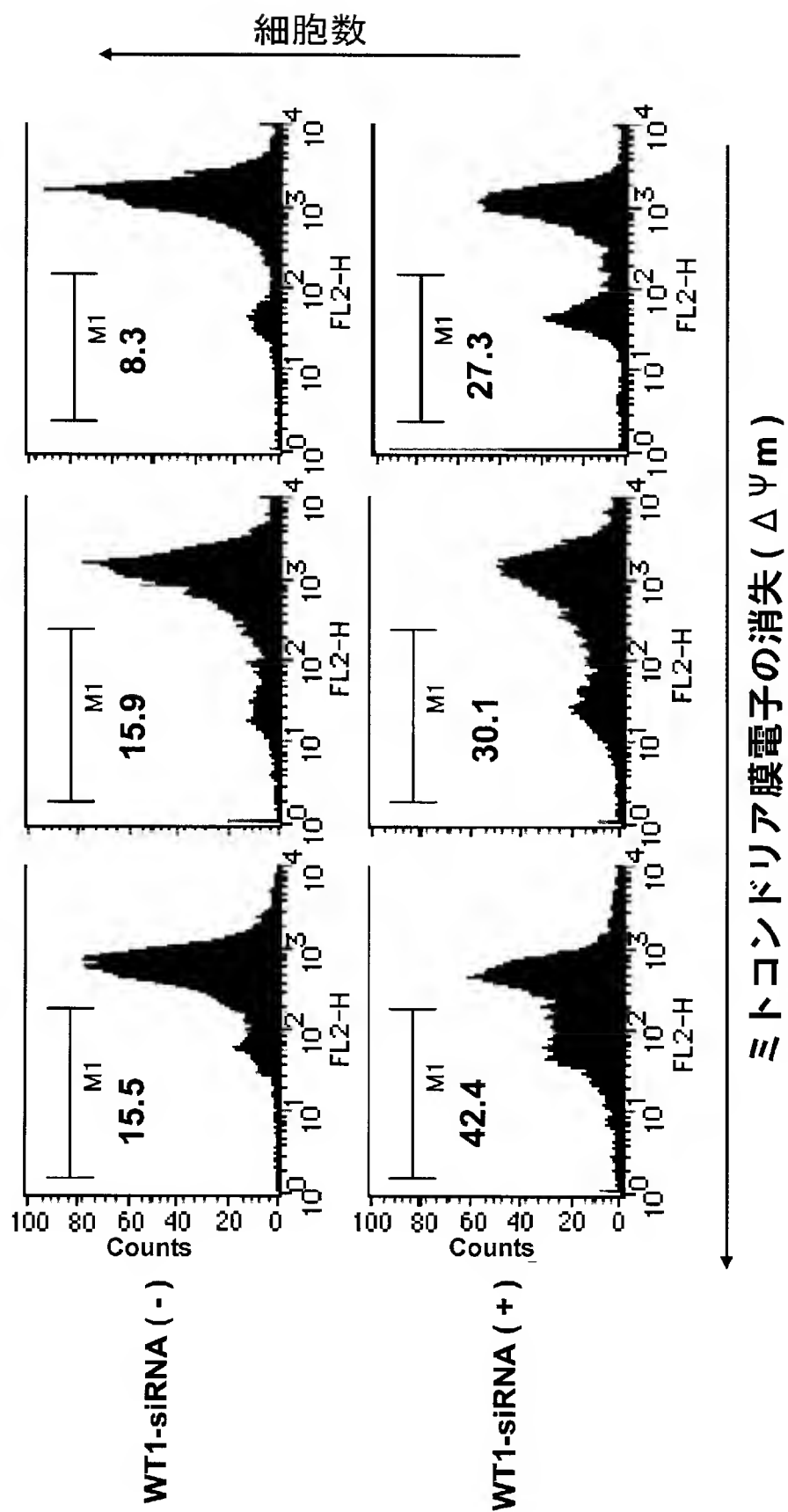


[図15]

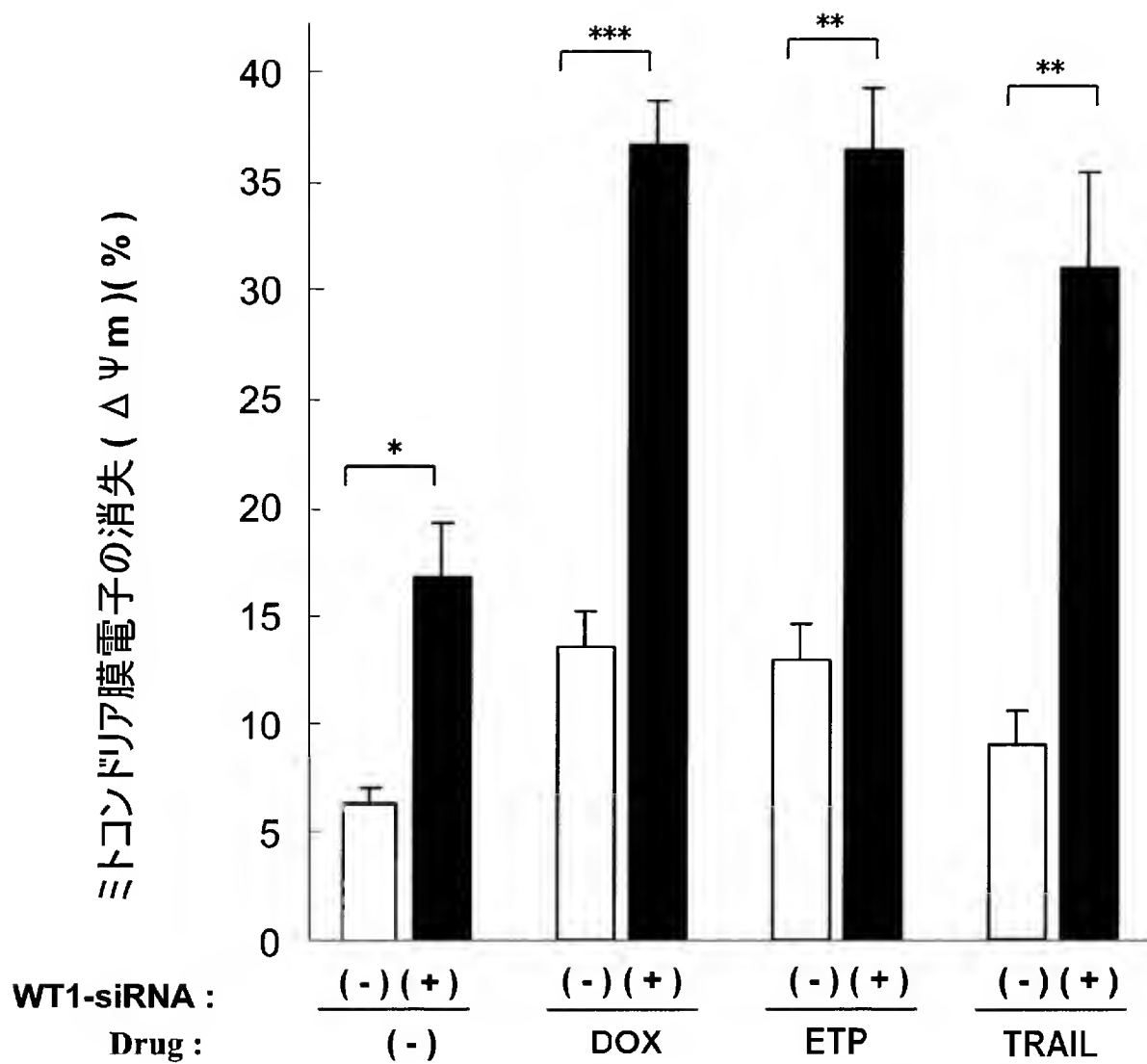


	+ DOX		+ ETP		+ TRAIL	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
WT1-siRNA:						
チトクロム C						
GAPDH						

[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7088, A61P35/00, 35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7088, A61P35/00, 35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MURATA, Yoji et al., The Wilms tumor suppressor gene WT1 induces G1 arrest and apoptosis in myeloblastic leukemia M1 cells, FEBS Letters, 1997, Vol.409, No.1, pages 41 to 45	1-7
Y	INOUE, K. et al., Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood., 1998, Vol.91, No.8, pages 2969 to 2976	1-7
Y	OJI, Y. et al., Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumor and its involvement in tumor cell growth, Japanese Journal of Cancer Research, 1999, Vol.90, pages 194 to 204	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June, 2005 (21.06.05)

Date of mailing of the international search report

05 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005824

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DAVIES, Jamie A. et al., Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumor suppressor is required for nephron differentiation, Human Molecular Genetics, 15 January, 2004 (15.01.04), Vol.13, No.2, pages 235 to 246	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005824

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of claim 1 relates to a cytostatic agent comprising as an active ingredient any of the following: (a) double stranded RNA containing RNA complementary to a transcription product of WT1 gene and RNA complementary to the RNA, (b) DNA coding for the double stranded RNA (a), and (c) vector having the DNA (b) inserted therein. However, as the siRNA targeting WT1 gene is publicly known, there is no common matter, considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, to the invention of claims 1-7, invention of claims 8-12, invention of claims 13-14, invention of claims 15-16, invention of claims 17-18 and invention of claims 19-20. (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 - 7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005824

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Consequently, no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among the different inventions. Therefore, as among these inventions, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features, it does not appear that these inventions are linked with each other so as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7088, A61P35/00, 35/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7088, A61P35/00, 35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MURATA, Yoji et al., The Wilms tumor suppressor gene WT1 induces G1 arrest and apoptosis in myeloblastic leukemia M1 cells, FEBS Letters, 1997, Vol.409, No.1, p.41-45	1-7
Y	Inoue K. et al., Wilms' tumor gene(WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood, 1998, Vol.91, No.8, p.2969-2976	1-7
Y	Oji Y. et al., Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.2005

国際調査報告の発送日

05.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4C

9454

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	<p>tumors and its involvement in tumor cell growth, Japanese Journal of Cancer Research, 1999, Vol. 90, p. 194-204</p> <p>DAVIES, Jamie A. et al., Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumor suppressor is required for nephron differentiation, Human Molecular Genetics, 2004. 01. 15, Vol. 13, No. 2, p. 235-246</p>	1 - 7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に係る発明は、以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤に関するものである。(a) WT1 遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA、(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA、(c) (b)のDNAが挿入されたベクター。しかし、WT1 遺伝子を標的とするsiRNAは公知であるから、請求項1-7に係る発明と、請求項8-12に係る発明、請求項13-14に係る発明、請求項15-16に係る発明、請求項17-18に係る発明、請求項19-20に係る発明は、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13.3の意味における技術的な関連を見いだすことはできず、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-7

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。